

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-095579

(43)Date of publication of application : 10.04.2001

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
C12N 1/21
C12Q 1/68
// C02F 3/34
(C12N 15/09
C12R 1:07)
(C12N 1/21
C12R 1:07)
(C12Q 1/68
C12R 1:07)

(21)Application number : 11-276053

(71)Applicant : MITSUI ENG & SHIPBUILD CO LTD

(22)Date of filing : 29.09.1999

(72)Inventor : TAKAOKA KAZUE

(54) METHOD FOR DETECTING MICROORGANISM

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for detecting a microorganism which has a common base sequence among microorganisms which belong to the genus Bacillus without using several kinds of probes.

SOLUTION: This method comprises using a probe selected from probes having base sequences shown by sequences 1-4, which are common among microorganisms belonging to the genus Bacillus. 1 5' gtaccgacctattcgaacg3' 2 5' cgaagccacctttatg3' 3 5' ccccaatcatctgtccca3' 4 5' atgcgcgcgggcccatctg3'.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

17.03.2006

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the
examiner's decision of rejection or application converted
registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of
rejection]

[Date of extinction of right]

*** NOTICES ***

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The detection approach of the microorganism characterized by detecting the microorganism which belongs to a Bacillus group using the nucleic acid probe which has a base sequence common to the microorganism belonging to a Bacillus group.

[Claim 2] The approach according to claim 1 by which the code of said base sequence is carried out to 16srDNA(s).

[Claim 3] The approach according to claim 1 by which said base sequence is included in 16srRNA(s).

[Claim 4] The approach given in claim 1 written said base sequence is either of the four following arrays.

1 5'Gtaccgccctattcgaacg3' 2 5'Cgaagccaccttttatg3' 3 5'Ccccaatcatctgtcca3' 4 5'AtgcgcgcgggcccatctG3'

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the approach of detecting the microorganism which belongs to a Bacillus group using a nucleic acid probe including all the all [a part or] by which a code is carried out to 16srDNA(s) common to especially a Bacillus group, about the detection approach of a microorganism.

[0002]

[Description of the Prior Art] In the water treatment technique by biological treatment, its resolvability of starch, fats and oils, etc. is high, and since the microorganism belonging to a Bacillus group produces various antibiotics and antimicrobial, whenever [on waste water treatment / attention] is high. Moreover, by forming a spore, the microorganism belonging to a Bacillus group has the description as thermophilic bacteria, and is considered to be the leading role in microorganism treatment in an elevated temperature, such as compost. In the water treatment and refuse disposal by biological treatment, it is thought that the role which a Bacillus group microorganism plays is high. Then, it is necessary to detect the existence of a Bacillus group microorganism.

[0003] Although detection of a Bacillus group microorganism is performed using the standard detection culture medium from the former, no bacilli can be detected and Bacillus **** also not necessarily grows up. Recently, the detection approach using a nucleic acid probe progresses, and, thereby, the microorganism belonging to a Bacillus group is also detected increasingly. However, the present condition is the probe which covers many Bacillus groups not being developed, but having to produce each probe.

[0004] Fluorescence which performs hybridization using the fluorescent probe which made the rRNA array the target as an approach of detecting only a specific microorganism specifically in recent years, and **** specific bacteria under a fluorescence microscope in situ Hybridization (FISH) is spreading. rRNA is RNA which constitutes a ribosome and can find out a unique array in common on level, such as **, a group, and a kind. Therefore, detection of the specific bacteria based on the genetic information in ** or group level is attained by using the array according to the purpose as a probe. However, although comparatively many probe designs on seed level are seen in the design of a probe, there is no probe in ** and group level not much. Then, a probe which detects the microorganism in group level is desired.

[0005] by the way, the microorganism which acts to the Bacillus group supposed that important work is carried out in living thing-water treatment or compost as a group -- a June, 1999 current -- setting -- a rRNA number of registration -- **** -- it is necessary to design many probes to detect the Bacillus group microorganism in those with 321 sort, and a specimen

[0006]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] The technical problem of this invention conquers the trouble of the above present condition, and is to offer the approach of detecting the Bacillus group microorganism which has a base sequence common among the microorganisms which belong to a Bacillus group, without producing how many sort thing probe.

[0007]

[Means for Solving the Problem] In order to attain the above-mentioned technical problem, the invention by which an application for patent is carried out by this application is as follows.

- (1) The detection approach of the microorganism characterized by detecting the microorganism which belongs to a Bacillus group using the nucleic acid probe which has a base sequence common to the microorganism belonging to a Bacillus group, and to carry out.
- (2) The approach given in (1) that the code of said base sequence is carried out to 16srDNA(s).
- (3) The approach given in (1) that said base sequence is included in 16srRNA(s).

[0008] (4) The approach given in (1) written said base sequence is either of the four following arrays.

1 5'Gtaccgcctattgaacg3' 2 5'cgaagccacctttatg3' 3 5'ccccaatcatctgtccca3' 4 In 5'atgcgcgcgggcccatctg3' this invention In the approach of detecting the microorganism which belongs to a Bacillus group using a nucleic acid probe The base sequence of the probe designed in order to detect the fungus classified into the Bacillus group which exists in specimens, such as sludge and compost, according to a probe common to some Bacillus groups is as follows.

[0009]

Probe 1 5'gtaccgcctattgaacg3' Probe 2 Although bacilli other than 5'cgaagccacctttatg3' and very few Bacillus groups can also be detected, the base sequence of the probe which has the application of screening as a probe common to many Bacillus **** is as follows.

probe 3 5'ccccaatcatctgtccca3' Probe 4 5'atgcgcgcgggcccatctg3' -- these probes are the base sequences which carried out [bacillus] at several sorts of Bacillus(es), and this array and the bacillus which can be hybridized can be detected as a bacillus of a Bacillus group.

[0010]

[Embodiment of the Invention] It is Bacillus when the 16srRNA base sequence was investigated about the stock isolated out of the sludge sample, in order to detect the bacteria classified into an example Bacillus group in said FISH method. It was in agreement with subtilis [gene=rrnO]. This Bacillus The recognition primer containing subtilis [gene=rrnO] was designed and an above-mentioned probe 1 and an above-mentioned probe 2 were designed.

[0011] About said probe 1, the air dried of E.coli (NIHJ44) and the Bacillus subtilis (ATCC6051) was carried and carried out to the fungus body and slide glass which were fixed in the paraform by the well-known approach. After dehydrating the sample in alcohol by the well-known approach, only about the Bacillus sample, 65 degrees C, and DTT (dithiothreitol) / SDS processing for 30 minutes were succeeding performed with 37 degrees C and the lysozyme processing for 10 minutes, and the sample was again dehydrated in alcohol.

[0012] Next, hybridization was performed to both samples by the well-known approach using the probe EUB338 common to all fungi, and said probe 1 as follows. Namely, 0.9M NaCl, 50% A paraform, 0.01% Hybridization of SDS and pH7.2 What mixed the buffer for

the probe which adjusted the buffer and was adjusted to 50 ng/ μ l at a rate of 1:8 was adjusted. The probe was respectively dropped at the sample on a slide glass, and it hybridized at 44 degrees C for 3 hours. Then, after performing 46 degrees C and washing for 20 minutes, it observed with the incident light mold fluorescence microscope.

[0013] Consequently, in the probe EUB338, since the fluorescent probe hybridized in both samples, fluorescence observation was accepted. On the other hand, it is Bacillus, although observation was not completed in Ecoli with a probe 1 since it did not hybridize. The fluorescence observation by hybridization was checked in subtilis (ATCC 6-51). In addition, all performed counterstain by DAPI and distinguished the fungus body.

[0014] About the sludge sample extracted from the water treatment place, paraformaldehyde immobilization was performed by the well-known approach. After carrying and carrying out the air dried of this sludge to a slide glass, alcoholic dehydration was performed by the well-known approach. Hybridization after performing pretreatment by the lysozyme and DTT/SDS like the above The probe adjusted by the buffer was dropped on the slide glass, and hybridization was performed. Similarly, after performing said counterstain by after [DAPI] washing, it ****(ed). Thereby, existence of the Bacillus group in sludge was checked.

[0015]

[Effect of the Invention] According to this invention, it became possible to screen and detect with a few [microorganism / belonging to a Bacillus group] probes.

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2001-95579
(P2001-95579A)

(43) 公開日 平成13年4月10日 (2001.4.10)

(51) Int.Cl.	識別記号	F I	テマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 1/21	4 B 0 2 4
1/21		C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/68		C 0 2 F 3/34	Z 4 B 0 6 5
// C 0 2 F 3/34		C 1 2 R 1:07)	4 D 0 4 0
(C 1 2 N 15/09	Z N A	(C 1 2 N 1/21	

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 3 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平11-276053

(22) 出願日 平成11年9月29日 (1999.9.29)

(71) 出願人 000005902

三井造船株式会社

東京都中央区築地5丁目6番4号

(72) 発明者 高岡 一栄

千葉県市原市八幡海岸通1番地 三井造船
株式会社千葉事業所内

(74) 代理人 100076587

弁理士 川北 武長

Fターム (参考) 4B024 AA11 BA80 CA01 CA04 CA09

CA11 GA30 HA12

4B063 QA01 QQ06 QQ50 QQ54 QR75

QS32 QS34

4B065 AA16Y AB01 BA30 CA46

4D040 DD03 DD11

(54) 【発明の名称】 微生物の検出方法

(57) 【要約】

【課題】 幾種ものプローブを作製せずに Bacillus 属に属する微生物のうち共通の塩基配列を有する Bacillus 属微生物を検出する方法を提供する。 *

* 【解決手段】 Bacillus 属に属する微生物に共通している下記塩基配列を有する核酸プローブを用いて Bacillus 属に属する微生物を検出することを特徴とする微生物の検出方法。

- 1 5' g t a c c g c c c t a t t c g a a c g 3'
- 2 5' c g a a g c c a c c t t t t a t g 3'
- 3 5' c c c c a a t c a t c t g t c c c a 3'
- 4 5' a t g c g c c g c g g g c c c a t c t g 3'

【特許請求の範囲】

【請求項1】 Bacillus属に属する微生物に共通している塩基配列を有する核酸プローブを用いてBacillus属に属する微生物を検出することを特徴とする微生物の検出方法。

【請求項2】 前記塩基配列が16srDNAにコード*

```

1 5' gtaccgcccctattcgaacg3'
2 5' cgaagccaccttttatg3'
3 5' ccccaaatcatctgtccca3'
4 5' atgcgccgcgggcccatctg3'

```

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は微生物の検出方法に関し、特にBacillus属に共通の16srDNAにコードされる塩基配列の一部もしくはすべてを含む核酸プローブを用いてBacillus属に属する微生物を検出する方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】生物処理による水処理技術において、Bacillus属グループに属する微生物は澱粉、油脂などの分解性が高く、種々の抗生物質や抗菌物質を産出することから廃水処理上の注目度が高い。また、Bacillus属に属する微生物は孢子を形成することにより耐熱性菌としての特徴を有し、コンポストなど高温での微生物処理における主役と考えられている。生物処理による水処理やごみ処理において、Bacillus属微生物の果たす役割は高いと考えられている。そこで、Bacillus属微生物の有無を検出する必要がある。

【0003】従来から標準的な検出培地を用いてBacillus属微生物の検出が行われているが、すべての菌を検出することはできず、また必ずしもBacillus属菌が成育するとも限らない。最近、核酸プローブを用いた検出方法が発達し、Bacillus属に属する微生物もこれにより検出されるようになってきている。しかしながら、多くのBacillus属を網羅するプローブは開発されておらず、個々のプローブを作製しなければならないのが現状である。

【0004】近年、特定の微生物のみを特異的に検出する方法としてrRNA配列を標的とした蛍光プローブを用いたハイブリダイゼーションを行い、蛍光顕微鏡下で特定の細菌を標出する蛍光 in situ ハイブリダイゼーション(FISH)が普及しつつある。rRNAはリボソームを構成するRNAであり、科、属、種と※

```

1 5' gtaccgcccctattcgaacg3'
2 5' cgaagccaccttttatg3'
3 5' ccccaaatcatctgtccca3'
4 5' atgcgccgcgggcccatctg3'

```

本発明において、核酸プローブを用いてBacillus属に属する微生物を検出する方法において、幾つかの

* されている請求項1記載の方法。

【請求項3】 前記塩基配列が16srRNAに含まれる請求項1記載の方法。

【請求項4】 前記塩基配列が下記の4つの配列のいずれかである請求項1記載の方法。

※いったレベルで共通な、または特異な配列を見出すことができる。したがって、目的に応じた配列をプローブとして利用することによって科や属レベルでの遺伝情報をもとにした特定細菌の検出が可能になる。しかしながら、プローブの設計において種レベルでのプローブ設計は比較的多く見られるが、科、属レベルでのプローブはあまりない。そこで、属レベルでの微生物を検出するプローブが望まれる。

【0005】ところで、生物的水処理やコンポストにおいて重要な働きをしているとされるBacillus属にグループされる微生物は、1999年6月現在においてrRNA登録数についてだけでも321種あり、検体中のBacillus属微生物を検出するには幾つものプローブを設計する必要がある。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、上記のような現状の問題点を克服し、幾種ものプローブを作製せずにBacillus属に属する微生物のうち共通の塩基配列を有するBacillus属微生物を検出する方法を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】上記課題を達成するため、本願で特許請求される発明は下記のとおりである。

(1) Bacillus属に属する微生物に共通している塩基配列を有する核酸プローブを用いてBacillus属に属する微生物を検出することを特徴とする微生物の検出方法。

(2) 前記塩基配列が16srDNAにコードされている(1)記載の方法。

(3) 前記塩基配列が16srRNAに含まれる(1)記載の方法。

【0008】(4) 前記塩基配列が下記の4つの配列のいずれかである(1)記載の方法。

Bacillus属に共通のプローブで汚泥、コンポストなどの検体中に存在するBacillus属に分類さ

れる菌類を検出するために設計したプローブの塩基配列 * 【0009】
は以下のとおりである。

プローブ1 5' gtaccggccctatttcgaacg3'

プローブ2 5' cgaagccaccttttatg3'

また、ごくわずかの *Bacillus* 属以外の菌をも検出し得るが、多くの *Bacillus* 属菌に共通のプロ ※ プrobeとしてスクリーニングの用途のあるプローブの塩基配列は下記のとおりである。

プローブ3 5' ccccaatcatctgtccca3'

プローブ4 5' atgcgccgcgggcccatctg3'

これらのプローブは数種の *Bacillus* に菌共通した塩基配列であり、この配列とハイブリダイズし得る菌は *Bacillus* 属の菌として検出することができる。

【0010】

【発明の実施の形態】実施例

Bacillus 属に分類される細菌を前記 FISH 法において検出するために、汚泥サンプル中から単離した株についてその 16S rRNA 塩基配列を調べたところ、*Bacillus subtilis* (gene = rrnO) と一致した。この *Bacillus subtilis* (gene = rrnO) を含む認識プライマーの設計を行い、前述のプローブ1およびプローブ2を設計した。

【0011】前記プローブ1について、*E. coli* (NIHJ44) と *Bacillus subtilis* (ATCC6051) を公知の方法でパラホルムにて固定した菌体とスライドガラスにのせて風乾させた。公知の方法にてアルコールでサンプルの脱水を行ってから、*Bacillus* サンプルについてのみ 37℃、10 分間のリゾチーム処理と、引き続いて 65℃、30 分間の DTT (ジチオスレイトール) / SDS 処理を行って再度アルコールでサンプルを脱水した。

【0012】次に、両サンプルに全真菌共通のプローブ EUB338 と前記プローブ1を用いて以下のとおり公知の方法でハイブリダイゼーションを行った。すなわち、0.9M NaCl、50% パラホルム、0.01% SDS、pH7.2 のハイブリダイゼーション ★

10 ★バッファーを調整し、50ng/μl に調整したプローブをバッファーを 1:8 の割合で混合したものを調整した。各々スライドガラス上のサンプルにプローブを滴下して、44℃にて3時間ハイブリダイズした。その後、46℃、20分の洗浄を行った後、落射型蛍光顕微鏡にて観察した。

【0013】その結果、プローブ EUB338 では両方のサンプルにおいて蛍光プローブがハイブリダイズしたためによる蛍光観察が認められた。一方、プローブ1では *E. coli* ではハイブリダイズしなかったため観察ができなかったが、*Bacillus subtilis* (ATCC6051) ではハイブリダイズによる蛍光観察が確認された。なお、いずれも DAPI による対比染色を行って菌体の判別を行った。

【0014】水処理場から採取した汚泥サンプルについて、公知の方法でパラホルムアルデヒド固定を行った。この汚泥をスライドガラスにのせ風乾させた後、公知の方法でアルコール脱水を行った。前記と同様リゾチームと DTT / SDS による前処理を施した後、ハイブリダイゼーション バッファーで調整したプローブをスライドガラス上に滴下し、ハイブリダイゼーションを行った。前記同様、洗浄後 DAPI による対比染色を行ってから検視した。これにより汚泥中の *Bacillus* 属の存在が確認された。

【0015】

【発明の効果】本発明によれば、*Bacillus* 属に属する微生物について数少ないプローブでスクリーニングおよび検出することが可能になった。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

FI

ターコード (参考)

C12R 1:07)

(C12N 1/21

C12R 1:07)

(C12Q 1/68

C12R 1:07)

C12R 1:07)

(C12Q 1/68

C12R 1:07)

C12N 15/00

C12R 1:07)

A

ZNAA